

# Electrophorèse

## application à l'identification clonale de l'hévéa

**Leconte A., Lebrun P., Nicolas D., Seguin M.**

CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

**S**ource principale de caoutchouc naturel, l'*Hevea brasiliensis* couvre actuellement 9,5 millions d'hectares dans le monde et dans la quasi-totalité des plantations, les variétés cultivées (clones) sont multipliées végétativement par greffage.

Cette forme de propagation utilise des quantités importantes de bois de greffe, qui est produit dans des structures agricoles spécialisées appelées «jardins à bois de greffe», ou plus communément «jardins à bois».

Ces derniers se doivent d'être «conformes» et pourtant de nombreuses sources d'erreurs peuvent en entacher la pureté : erreurs de pancartage, sources d'approvisionnement douteuses, gourmands du porte-greffe non éliminés... Cela entraîne alors soit une appellation erronée, soit la présence dans une parcelle d'un certain pourcentage de plants n'appartenant pas au clone multiplié.

L'incidence économique d'une erreur en jardin à bois est parfois considérable :

- un clone peut être greffé à la place d'un autre, alors que ses caractéristiques agronomiques telles que la sensibilité à la casse ou aux maladies sont inadaptées à la zone considérée ;
- le taux d'impureté d'un jardin à bois se retrouve en plantation avec un fort taux multiplicateur ; le niveau de pro-

En jardins à bois, les variétés cultivées (clones de greffe) présentent peu de caractères morphologiques distinctifs et il n'existe aujourd'hui aucun moyen, totalement efficace, d'identification des clones basé sur des critères visuels.

Parmi les techniques de reconnaissance visuelle des clones d'hévéa, on peut citer tout d'abord la méthode reposant sur l'évaluation qualitative d'environ 20 caractères foliaires (Recueil de fiches de clones *Hevea*, 1993). Elle a l'avantage de pouvoir être appliquée dans des jardins à bois de greffe très jeunes. Mais elle n'est pas absolue : il faut en effet observer un ensemble de feuilles et un ensemble d'individus important pour avoir un bon descriptif. Elle nécessite de plus un très bon entraînement et même une formation spéciale. Il faut également pouvoir disposer d'un bon référentiel qui reste à créer pour la majorité des clones. Les spécialistes prétendant pouvoir reconnaître les clones par cette technique sont rares et leur jugement sujet à caution : une enquête menée en Indonésie a montré qu'un technicien spécialisé pouvait reconnaître 80 % des clones dans un jardin à bois assez pur, mais que ce taux pouvait diminuer fortement lorsque le jardin était très mélangé. Avec cette méthode, il peut aussi arriver qu'un clone soit confondu avec un autre.

### ■ Incidence économique de non conformité en jardin à bois de greffe

Un taux d'impureté, même minime, en jardin à bois (J.B.) se répercute en plantation avec un fort taux multiplicateur, ce qui entraîne une réduction du niveau de production et de la rentabilité économique des surfaces plantées.

Ceci peut être illustré par la simulation suivante :

- L'établissement d'un hectare de jardin à bois coûte : 80 000 FF.
- Il permet de réaliser 250 ha de plantation/an, soit 2 500 ha de plantation en dix ans (durée de vie moyenne d'un J.B.).
- Soit un J.B. constitué à 90 % d'un clone haut-producteur, dont le niveau serait de 2 t/an (moyenne des dix premières années d'exploitation) et à 10 % d'un matériel végétal non conforme dont le niveau de production serait de 1,5 t/an.
- Le manque à produire d'une plantation constituée à partir d'un tel J.B., par rapport à une plantation établie à partir d'un J.B. pur, sera de 50 kg/ha/an, ce qui représente, pour les 2500 ha constitués à partir du J.B. initial d'un hectare :  $50 \times 2\,500 = 125\,000$  t/an. À 6 000 FF la tonne de caoutchouc, le manque à gagner serait de 0,75 million de FF par an !

Appliquons ce cas de figure à un projet de développement d'une plantation de 5 000 ha, qui serait réalisé en cinq ans, avec 5 ha de J.B. dont le coût de réalisation serait de 400 000 FF.

Minimisons le taux d'impureté en J.B. à 5% (puisque'il s'agit d'un nouveau projet) et limitons à - 20% le potentiel de production du matériel non conforme par rapport au clone de référence.

- Le manque à produire serait de 40 kg/ha/an, soit 200 t/an pour la plantation,
- soit encore 1,2 million de FF/an,
- pour vingt ans : 24 millions de FF à comparer au 0,4 million de FF d'installation des J.B.!

de graine particulier (Recueil de fiches de clones *Hevea*, 1993), mais cette méthode n'est applicable que dans des plantations adultes. Elle nécessite un coup d'oeil exercé et un référentiel fiable. C'est cependant un bon moyen pour juger si une parcelle est pure ou composée d'un mélange de clones.

C'est pourquoi, l'utilisation de marqueurs génétiques moléculaires, permettant de caractériser génotypiquement des clones à un stade précoce de leur croissance, a été envisagée.

En Asie, quelques tentatives d'identification clonale basées sur la séparation électrophorétique de protéines du sérum de latex furent conduites (Walujono et Agung Suseno, 1973 ; Walujono et Effendi, 1976 ; Yeang *et al.*, 1977), mais ne débou-

chèrent pas sur la vulgarisation de protocoles fiables, utilisables en routine.

Depuis une dizaine d'années, la technique d'électrophorèse d'isozymes (encadré 2) a été développée sur hévéa dans les laboratoires du CIRAD. Utilisée dans un premier temps pour l'étude de la diversité génétique des populations de clones sélectionnés et cultivés (clones «Wickham») et du matériel génétique issu de prospections en Amazonie (Chevallier, 1988 ; Chevallier *et al.*, 1988), cette technique s'est révélée particulièrement performante et a pu être appliquée à l'identification clonale. Plus récemment, la technique d'empreintes génétiques par RFLP (polymorphisme de longueur de fragments de restriction) a été mise au point et s'est montrée encore plus efficace que les isozymes pour l'identification clonale de l'hévéa (Seguin, 1992 ; Besse *et al.*, 1993). Mais le développement des RFLP est actuellement freiné par la longueur des expérimentations, l'emploi d'isotopes radioactifs et le coût des techniques de biologie moléculaire.

## Electrophorèse d'isozymes

Ainsi, la technique des isozymes reste-t-elle très intéressante pour des applications à grande échelle. Basée sur la variabilité génétique des clones, traduite en termes de variabilité isoenzymatique, elle permet d'établir de véritables empreintes génétiques au niveau enzymatique. Utilisée pour l'identification variétale chez de nombreuses espèces, l'électrophorèse d'isozymes a été mise au point pour l'hévéa, à partir d'extraits protéiques foliaires, en utilisant 12 systèmes enzymatiques révélés sur gel d'amidon (Lebrun et Chevallier, 1990). Elle a été testée sur de nombreux génotypes.

Son pouvoir de discrimination est remarquable : une étude portant sur 73 clones d'Extrême-Orient (clones Wickham) a révélé 71 génotypes différents, ce qui correspond à un pouvoir de séparation de 98 % des clones de cette population.

Elle permet de reconnaître à coup sûr les clones qui ont déjà été décrits et répertoriés dans une base de données. Aujourd'hui, cette base de données comporte les génotypes isoenzymatiques de référence de 254 clones sélectionnés (114 clones Wickham, 81 clones IRCA et 59 clones sud-américains).

L'électrophorèse d'isozymes est donc actuellement la méthode d'identification

clonale de l'hévéa à la fois la plus fiable, la plus simple et la moins onéreuse. Le département des cultures pérennes du CIRAD (CIRAD-CP) l'exploite en routine en proposant des contrôles de conformité clonale en jardins à bois ou des analyses de service pour des besoins internes. Cela a été le cas pour des analyses effectuées en collaboration avec l'équipe de culture *in vitro* hévéa, en vue de vérifier en serre la conformité des clones avant leur introduction en micropropagation. Des contrôles, portant sur un échantillon de plants après sortie de tube, ont également été réalisés et ont confirmé l'identité génétique du matériel multiplié *in vitro*.

La technique d'électrophorèse d'isozymes présente cependant l'inconvénient de n'être utilisable que sur du matériel vivant, collecté à proximité immédiate du laboratoire, ou sur du matériel conservé par lyophilisation, ce qui requiert un appareillage délicat et onéreux.

## Laboratoire portable

Afin d'étendre l'application des isozymes, les protocoles et l'équipement nécessaires à leur réalisation ont été simplifiés. Les chercheurs et les techniciens du CIRAD-CP ont conçu une unité mobile d'électrophorèse ou «laboratoire portable». L'ensemble du matériel et des produits utilisés pour l'analyse de 500 individus a été réduit au point de tenir dans une malle : 100 x 55 x 35cm (photo 1). Avec cet équipement, un expert intervient directement sur plantation pour effectuer des contrôles de conformité. Les différentes manipulations nécessitent simplement de pouvoir disposer, sur place, d'une pièce propre avec pailasse, d'électricité, d'eau courante et d'un réfrigérateur-congélateur.

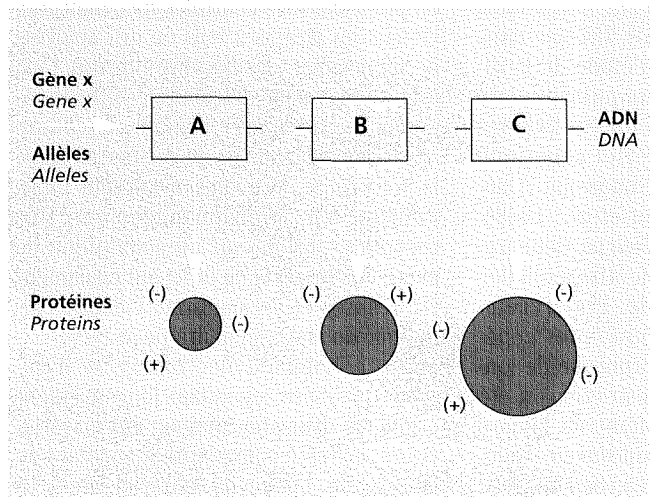
Depuis sa conception, ce laboratoire portable et son accompagnateur ont réalisé des expertises dans des localisations très variées, pour des centres de recherche ou dans des plantations industrielles : Côte d'Ivoire (IDEFOR/DPL, SOGB), Indonésie (IPARD), Guyane et Guadeloupe (collections du CIRAD). Dans toutes les situations, le laboratoire portable s'est révélé performant et son application sur près de 1 500 individus a permis de confirmer l'existence d'erreurs de conformité clonale en jardins à bois et en plantation, avec des taux variables selon les clones et les localisations.

Tout récemment, deux missions de conformité clonale ont été conduites au

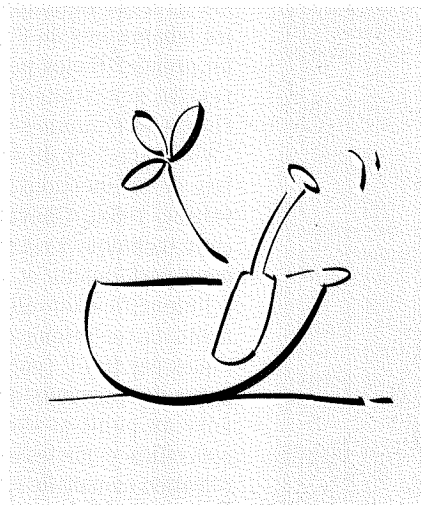


## L'électrophorèse d'isozymes

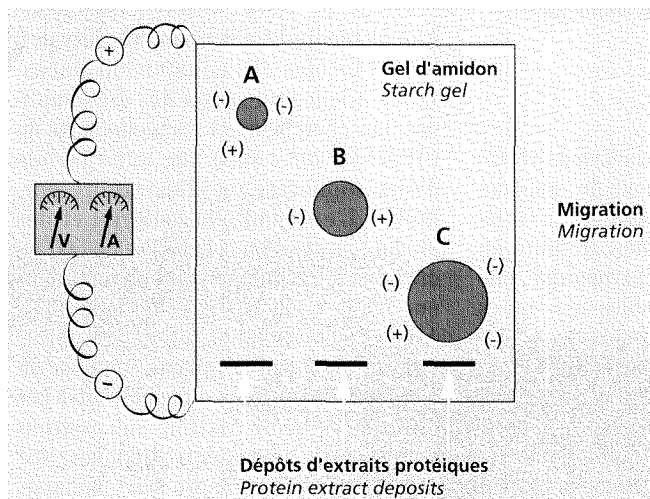
L'électrophorèse est une technique biochimique utilisée pour la séparation des protéines ; son principe est connu depuis la fin du 19ème siècle



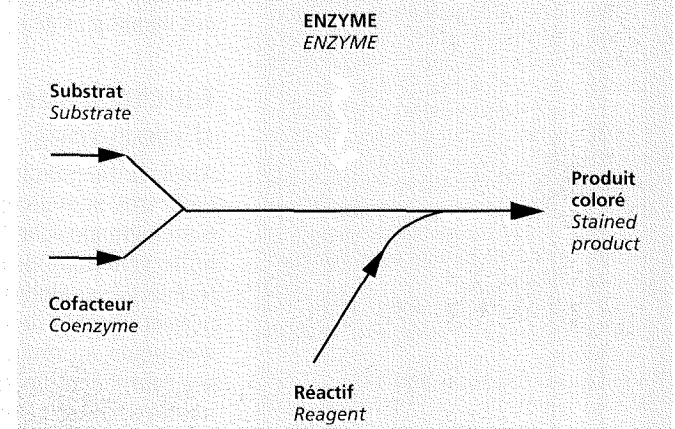
**1** Les protéines sont constituées d'un enchaînement d'acides aminés. Dans la plante, leur synthèse est contrôlée par les parties codantes de l'ADN : les gènes.  
*Proteins consist of a chain of amino acids. In plants, their synthesis is controlled by the coding parts of DNA: genes.*



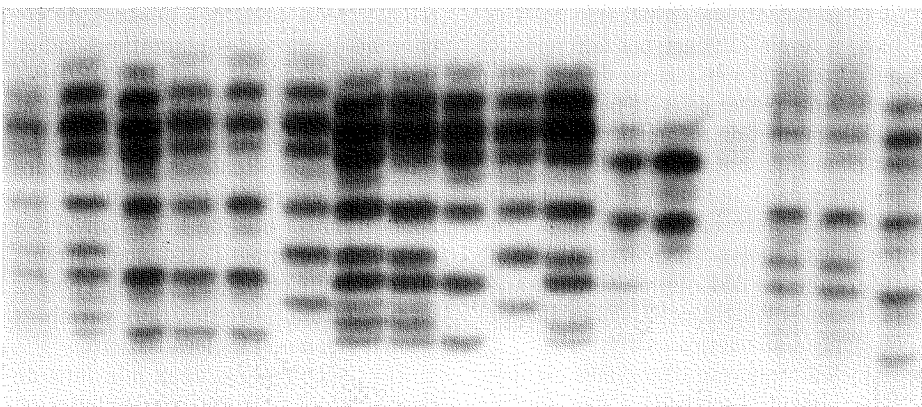
**2** Des extraits protéiques sont obtenus par broyage de feuilles en présence d'un tampon approprié.  
*Proteins extracts are obtained by crushing leaves in an appropriate buffer.*



**3** Déposés dans un support gélifié, les extraits protéiques sont soumis à un champ électrique. Les protéines se séparent en fonction de leur taille et de leur charge électrique.  
*After being deposited on a gel medium, the protein extracts are subjected to an electric field. The proteins separate according to their size and electrical charge.*



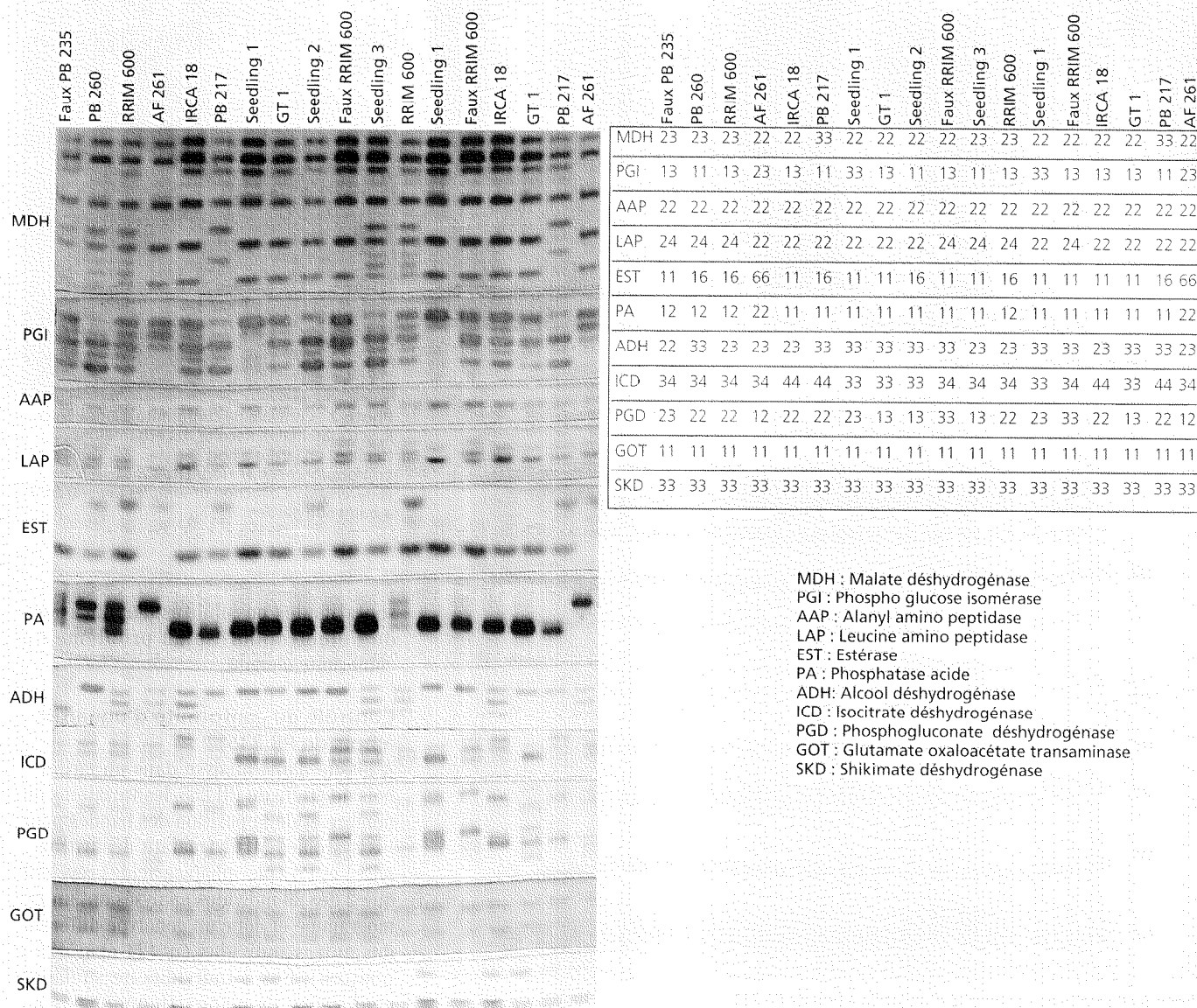
**4** Les enzymes sont des protéines jouant le rôle de catalyseurs biologiques. Leur activité est spécifique d'un substrat et d'un cofacteur particuliers. En présence de leur substrat, de leur cofacteur et d'un réactif approprié, une coloration apparaît dans le gel à l'endroit où la protéine enzymatique s'est positionnée au terme de la migration.  
*Enzymes are proteins that act as biological catalysts. Their action is specific to a given substrate and coenzyme. In the presence of their substrate, coenzyme and appropriate reagent, the gel becomes stained where the enzymatic protein comes to rest after migration.*



**5** Ces bandes colorées correspondent à des isozymes, c'est-à-dire à des enzymes possédant une même activité catalytique, et qui sont codées soit par des gènes différents soit par des allèles différents d'un même gène.  
*These stained bands correspond to isozymes, i.e. enzymes with the same catalytic activity, which are coded either by different genes, or by different alleles of a given gene.*

## Isozyme electrophoresis

Electrophoresis is a biochemical technique used for protein separation; its principle has been known since the end of the 19th century



MDH : Malate déshydrogénase  
 PGI : Phospho glucose isomérase  
 AAP : Alanyl amino peptidase  
 LAP : Leucine amino peptidase  
 EST : Estérase  
 PA : Phosphatase acide  
 ADH : Alcool déshydrogénase  
 ICD : Isocitrate déshydrogénase  
 PGD : Phosphogluconate déshydrogénase  
 GOT : Glutamate oxaloacétate transaminase  
 SKD : Shikimate déshydrogénase

La variabilité génétique entre individus se traduit par des variations du nombre et de la position des bandes d'isozymes. Des analyses génétiques ont permis de traduire les profils izoenzymatiques (ou zymogrammes) obtenus en termes de génotypes. L'exemple ci-contre présente, pour 11 locus enzymatiques, les zymogrammes de quelques plants d'hévéa (clones et seedlings), ainsi que leur interprétation en termes d'allèles. Les arbres d'un même clone présentent le même nombre et la même position des bandes.

Genetic variability between individuals is reflected in variations in the number and position of the isozyme bands. Genetic analyses have enabled interpretation of the isoenzymatic banding patterns (or zymograms) obtained in terms of genotypes. The example opposite shows the zymograms of a few rubber plants (clones and young plants from seeds or seedlings) for 11 enzymatic loci, along with their interpretation in terms of alleles. The trees of a given clone have the same number of bands in the same position.



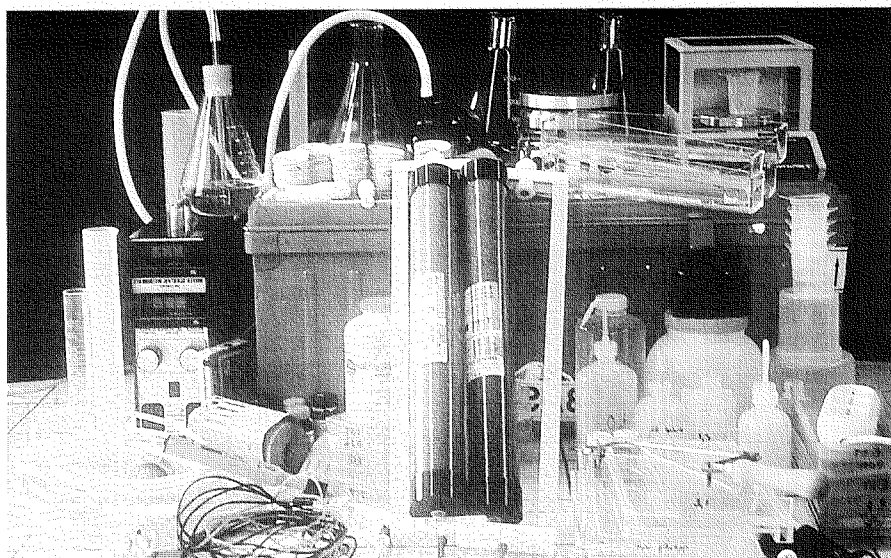


Photo P. Lebrun

**Photo 1 :** Laboratoire portable d'électrophorèse  
Portable electrophoresis laboratory



Photo A. Leconte

**Photo 2 :** Contrôle de conformité à Finca Entre Rios (Guatemala). Récolte des échantillons (feuilles) en jardin à bois  
Conformity check at Finca Entre Rios (Guatemala). Collection of samples (leaves) from a budwood garden

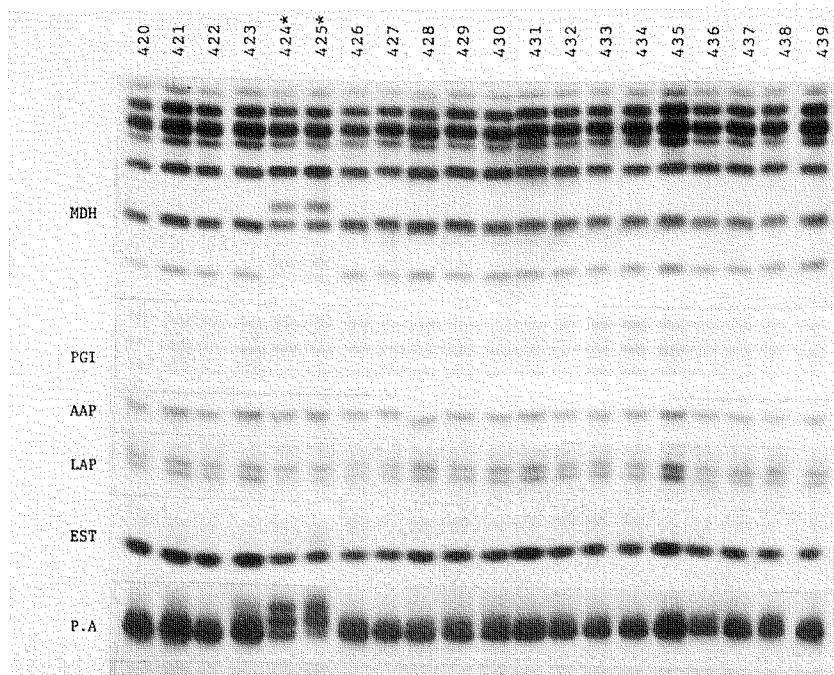


Photo P. Lebrun

**Photo 3 :** Contrôle de conformité d'un jardin à bois de PB 235  
420...439 : numéros d'identification des souches en J.B.  
\*génotypes non conformes au PB 235  
Conformity check in a PB 235 budwood garden  
420...439: identification numbers of budded stumps in B.G.  
\*genotypes not conforming to PB 235

sentatifs des possibilités d'applications de l'électrophorèse au problème de conformité clonale.

### Contrôle de conformité d'un jardin à bois de PB 235

A l'issue d'une analyse dans un jardin à bois de greffe de PB 235, les variations du nombre et de la position des bandes pour les systèmes MDH (malate déshydrogénase) et PA (phosphatase acide) révèlent que 2 des 20 individus analysés ont un zymogramme et donc un génotype différent des autres individus (n°424 et n°425 : photo 3). Ces 2 individus ne sont pas conformes, ils n'appartiennent pas au clone PB 235.

### Cas du PR 261 en Afrique

L'exemple du clone PR 261 dans un pays africain est lui aussi tout-à-fait représentatif des performances du laboratoire portable.

Dans un premier temps, l'analyse enzymatique d'un jardin à bois «source» de PR 261 avait révélé que le clone multiplié sous cette appellation avait un génotype différent du PR 261 d'Asie. Ce clone africain avait ainsi été rebaptisé AF 261. On pouvait alors s'attendre à ce que toutes les plantations de PR 261 du pays soient en fait de l'AF 261.

Guatemala, en collaboration avec la Gremial de Huleros (association de planteurs d'hévéas). Ces missions ont permis à la fois d'effectuer des contrôles de conformité dans 14 plantations de la côte Sud (photo 2), et de réaliser avec succès un transfert de technologie, avec livraison d'un laboratoire portable et formation de techniciens.

En Guyane, une unité d'électrophorèse a été installée dans les laboratoires du

CIRAD à Kourou, afin d'effectuer régulièrement des contrôles dans les jardins à bois de collection et de certifier par électrophorèse la conformité du matériel végétal distribué.

Un transfert de la technique est aussi en cours avec les plantations Michelin du Brésil.

Les deux exemples suivants, obtenus au cours de missions d'expertise réalisées avec le laboratoire portable, sont repré-



Par ailleurs, en plantation dans ce même pays, des observations en champ avaient mis en évidence, sur une parcelle monoclonale de PR 261, l'existence de deux phénotypes :

- un type d'arbre A, majoritaire et correspondant à un matériel haut producteur ;
- un type d'arbre B, minoritaire, présentant une forte sensibilité à la casse au vent entraînant une perte de productivité après plusieurs années.

L'analyse génotypique par isozymes, réalisée d'abord sur des arbres de cette plantation a montré que :

- les deux phénotypes A et B correspondaient effectivement à des génotypes différents, le type B n'étant identifiable à aucun clone connu ;
- le type A était lui même génétiquement hétérogène et constitué de deux génotypes : le premier, majoritaire, correspondait bien à celui de l'AF 261, le second n'étant identifiable à aucun clone connu.

Ainsi, cette parcelle de «PR 261» s'est révélée être une parcelle d'AF 261, «contaminée» par deux génotypes inconnus, aucun des trois génotypes ne correspondant au PR 261 d'Asie.

Toujours à l'aide du laboratoire portable, l'analyse du jardin à bois correspondant à la parcelle précédemment étudiée a ensuite été réalisée. Le génotype isoenzymatique, établi pour un échantillon de 81 souches, a montré que :

- les erreurs de conformité clonale provenaient du jardin à bois lui-même et non d'erreurs de greffage, les trois génotypes identifiés en plantation se retrouvant en proportions équivalentes dans les jardins à bois ;
- ces impuretés clonales n'étaient pas visuellement détectables à un stade juvénile, ce qui démontrait l'intérêt de l'application *in situ* des marqueurs isoenzymatiques.

## Conclusion

Lors de ses différentes interventions, le laboratoire portable d'électrophorèse a fait la preuve de sa grande efficacité à détecter sur le terrain les erreurs de conformité des clones d'hévéa.

Cette technique est cependant limitée par le nombre d'individus analysables par jour (25 en moyenne). Son application la plus performante réside dans les contrôles de jardins à bois de greffe. Par l'emploi d'un échantillonnage raisonné

en fonction du problème posé, elle permet, en cas d'hétérogénéité détectée, de repérer avec certitude les souches conformes qui serviront à la création de nouveaux jardins à bois de greffe parfaitement purs. A leur tour, ces derniers devront être contrôlés régulièrement, en fonction des recépages périodiques, sources d'erreurs potentielles.

Elle ne peut pas être utilisée, sauf cas particulier, pour résoudre *a posteriori* des problèmes d'identification dans les cas de mélanges de clones en plantation. Il ne s'agit pas non plus d'identifier «en aveugle» des clones d'origine inconnue, mais de vérifier, par comparaison à une référence, si tel ou tel clone correspond ou non à la dénomination qui en est proposée.

L'utilisation du laboratoire portable doit être largement développée, que ce soit sous forme de missions d'expertise ou de transferts de technologie. C'est d'ailleurs cette deuxième option qui est envisagée pour la mise en oeuvre prochaine de contrôles de conformité clonale en Indonésie et en Côte d'Ivoire.

Outre son application directe dans la production du matériel végétal des plantations, la technique d'électrophorèse d'isozymes présente d'autres possibilités d'applications, développées dans les laboratoires du CIRAD à Montpellier, en appui au programme d'amélioration génétique de l'hévéa : vérification de légitimité de descendance, étude de la pollinisation libre, gestion des ressources génétiques.

Aujourd'hui, l'électrophorèse d'isozymes utilisée pour l'identification clonale de l'hévéa, allie fiabilité, simplicité de mise en oeuvre et faible coût. Si son pouvoir de discrimination des génotypes est moins puissant que celui des méthodes de biologie moléculaire analysant directement l'ADN (RFLP), elle reste très compétitive dans la mesure où cette dernière méthode, trop lourde pour être transposable sur le terrain, est réservée à une utilisation bien spécifique en laboratoire. Néanmoins, de nouveaux outils de la biologie moléculaire, tels que la PCR (Polymérase Chain Reaction), pourraient ouvrir des perspectives intéressantes dans le domaine de l'identification clonale, en combinant la puissance de l'analyse au niveau de l'ADN, avec une méthodologie aussi simple que celle des isozymes et des possibilités d'automatisation.

## ■ Sigles

IDEFOR/DPL : Institut des forêts - Département des plantes à latex (Côte d'Ivoire)  
SOGB : Société des caoutchoucs de Grand-Béréby (Côte d'Ivoire)  
IPARD : Indonesian Planter's Association for Research and Development

## Bibliographie / References

- Besse P., Lebrun P., Seguin M., Lanaud C. (1993) DNA fingerprints in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) using human minisatellite probes. *Heredity* 70 (3) : 237-244.
- Chevallier M.H. (1988) Genetic variability of *Hevea brasiliensis* germplasm, using isozyme markers. *J. Nat. Rubber Res.* 3 (1) : 42-53.
- Chevallier M.H., Lebrun P., Normand F. (1988) Approach of the genetic variability of germplasm using enzymatic markers. In : *Colloque «Exploitation, physiologie et amélioration de l'hévéa»*, Paris, 2-7 novembre 1988, IRRDB, J.L. Jacob et J.C. Prévôt Ed., p. 365-376.
- Lebrun P., Chevallier M.H. (1990) *Starch and polyacrylamide gel electrophoresis of Hevea brasiliensis : a laboratory manual*. IRCA-CIRAD (Paris), 55 p.
- Recueil de fiches de clones *Hevea* (1993). CIRAD-CP (Montpellier), 170 p.
- Seguin M. (1992) Marqueurs moléculaires et identification clonale chez l'hévéa : développement des empreintes génétiques par RFLP et application «*in situ*» des isozymes. In : *Comité Scientifique et Technique du Caoutchouc*, Montpellier, 27 mars 1992, CIRAD-IRCA (Montpellier), p. 58-66.
- Walujono K., Agung Suseno P. (1973) Experiments with P.A.A. electrophoresis for *hevea* clones identification. In : *Symposium of International Rubber Research and Development Board*, Puncak, Indonesia, 2-4 July 1973, IRRDB (Brickendonbury), 21 p.
- Walujono K., Effendi S. (1976) Identifikasi klon *Hevea* dari pohon muda. *Menara Perkebunan* 44 (5) : 239-249.
- Yeang H.Y., Ghandimathi H., Paranjothy K. (1977) Protein and enzyme variation in some *Hevea* cultivars. *J. Rubber Res. Inst. Malaysia* 25 (1) : 9-18.

# Electrophoresis application to *Hevea* clone identification

Leconte A., Lebrun P., Nicolas D., Seguin M.

CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

Yields from a rubber plantation depend on the identity of its trees. Isozyme electrophoresis checks clone legitimacy right from the budwood garden stage, i.e. before they are planted for several decades.

**H***evea brasiliensis*, the main source of natural rubber, currently covers 9.5 million hectares worldwide and the varieties (clones) grown in virtually all the plantations are vegetatively propagated by budding.

This type of propagation uses considerable amounts of budwood, which is produced in special agricultural structures called «budwood gardens».

These budwood gardens have to be «true-to-type», but many sources of error can lead to impurities: identification panel errors, dubious supply sources, suckers not removed from rootstocks, etc. This subsequently leads either to wrong naming, or to the existence of a certain percentage of plants in a plot that do not belong to the clone being multiplied.

The economic impact of errors in a budwood garden is sometimes considerable:

- a clone may be budded instead of another, whereas its agronomic characteristics such as susceptibility to wind damage or diseases are unsuitable for the zone in question,
- the impurity rate in a budwood garden is greatly magnified in a plantation; yields and economic profitability can be substantially reduced (box 1).

In budwood gardens, the varieties cultivated (budded clones) have few distinctive morphological characters and there is currently no totally effective way of telling clones apart using visual criteria.

One *Hevea* visual recognition technique is based on a qualitative assessment of around 20 leaf characters (Recueil de fiches de clones *Hevea*, 1993). This method offers the advantage of being usable in very young budwood gardens, but it is not foolproof: in fact, it is necessary to observe a large number of leaves and individuals to obtain an accurate specification. It also requires a lot of practice and even special training. A reliable frame of reference is also required, which remains to be created for most clones. Specialists claiming to be able to recognize clones using this technique are few and far between and their judgement should be viewed with caution: a survey carried out in Indonesia showed that a specialized technician can recognize 80% of the clones in a fairly pure budwood garden, but this success rate falls

substantially if the garden is highly mixed. With this method, one clone can also be confused with another.

Another identification technique is based on seed observations. In fact, each clone has a particular type of seed (Recueil de fiches de clones *Hevea*, 1993), but this method can only be applied in adult plantations. It requires an experienced eye and a reliable frame of reference. However, it is a good way of judging whether a plot is pure or contains a mix of clones.

In view of these factors, consideration was given to using genetic molecular markers capable of genotypic characterization of clones at an early stage in their development.

In Asia, a few attempts were made to identify clones based on electrophoretic separation of proteins in latex serum (Walujono and Agung Suseno, 1973; Walujono and Effendi, 1976; Yeang *et al.*, 1977), but did not lead to the extension of reliable protocols that could be used on a routine basis.

Over the past ten years or so, the isozyme electrophoresis technique (box 2) has been developed on rubber in the CIRAD laboratories. This technique, which was first used to study the genetic diversity of selected and cultivated clone populations («Wickham» clones) and of germplasm obtained from surveys in the Amazon basin (Chevallier, 1988; Chevallier *et al.*, 1988), proved particularly effective and was applied to clone identification. More recently, genetic fingerprinting by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) has been developed and has proved even more effective than isozymes for *Hevea* clone identification (Seguin, 1992; Besse *et al.*, 1993). However, RFLP development is currently being held back by the length of the experiments, the use of radioactive isotopes and the cost of molecular biology techniques.

## Isozyme electrophoresis

Thus, the isozyme technique remains valid for large-scale experiments. It can provide veritable genetic fingerprints at enzyme level, based on the genetic variability of clones expressed in terms of isoenzymatic variability. Isozyme electrophoresis has been used for varietal identification of many plants and has been extended to *Hevea*, based on leaf protein

## Economic impact of non-conformity in budwood gardens

A level of impurity, however small, in a budwood garden (B.G.) is substantially magnified in plantations, causing a drop in yields and in the economic profitability of the areas planted.

This can be illustrated by the following simulation:

- Setting up one hectare of budwood garden costs FF 80,000.
- It can supply material for 250 ha of plantings/year, i.e. 2,500 ha of plantings in ten years (average life span of a B.G.).
- Given a B.G. comprising 90% of a high-yielding clone, which would produce 2 t/year (mean of the first ten years' tapping) and 10% of planting material that is not true-to-type, which would produce 1.5 t/year.
- The shortfall from a plantation set up from such a B.G. compared to a plantation set up from a pure B.G. will be 50 kg/ha/year, meaning, for the 2,500 ha set up from the initial one hectare B.G.:  $50 \text{ kg} \times 2,500 = 125 \text{ t/year}$ . At FF 6,000 per tonne of rubber, the lost opportunity would be FF 0.75 million per year.

Let us apply this example to a 5,000 ha development project to be implemented over five years, with 5 ha of B.G. which would cost FF 400,000 to set up.

Let us lower the impurity rate in the B.G. to 5% (since it is a new project) and limit the production potential of the material that is not true-to-type to -20% compared to the reference clone.

- The shortfall to be made up would be 40 kg/ha/year, i.e. 200 t/year for the plantation.
- or FF 1.2 million/year,
- over twenty years: FF 24 million compared to the FF 0.4 million spent on setting up the B.G.

extracts and using 12 enzyme systems developed on starch gel (Lebrun and Chevallier, 1990). It has been tested on numerous genotypes.

Its discrimination capacity is remarkable: a study of 73 clones from the Far East (Wickham clones) revealed 71 different genotypes, corresponding to 98% separation capacity for the clones in this population.

It ensures reliable recognition of the clones already described and inventoried in a data base. This data base now contains the isoenzymatic references of 254 selected clones (114 Wickham clones, 81 IRCA clones and 59 South American clones).

Isozyme electrophoresis is therefore the most reliable, simplest and cheapest *Hevea* clone identification method currently available. The CIRAD Tree Crops Department (CIRAD-CP) uses it on a routine basis, proposing clonal conformity checks in budwood gardens and service analyses for internal requirements. This was the case for analyses carried out jointly with the *Hevea in vitro* team, to check clone conformity in the greenhouse prior to micropropagation. Checks based on a sample of plants leaving tubes have also been made, confirming the genetic identity of material multiplied *in vitro*.

Nevertheless, the isozyme electrophoresis technique has one drawback. It can only be used on living material collected in the immediate vicinity of the laboratory, or on material preserved by freeze-drying, which requires complex, expensive equipment.

### Portable laboratory

In order to extend isozyme application, the protocols and equipment required have been simplified. CIRAD-CP researchers and technicians have designed a mobile electrophoresis unit or «portable laboratory». The equipment and products used to analyze 500 individuals have been reduced to such a point that they all fit into a trunk: 100 x 55 x 35 cm (photo 1). With this equipment, an expert can carry out conformity checks directly in a plantation. The different operations merely require on-site availability of a clean room with a work bench, electricity, running water and a fridge-freezer.

Since its design, this portable laboratory and its operator have carried out assessments in very different locations, for research centres or in estate plantations: Côte d'Ivoire (IDEFOR/DPL, SOGB), Indonesia (IPARD), French Guiana and Guadeloupe (CIRAD collections). In all these cases, the portable laboratory has proved effective and its use on almost 1,500 individuals has confirmed the existence of clonal conformity errors in budwood gardens and plantations, at varying rates depending on the clones and sites.

Very recently, two clone conformity missions were carried out in Guatemala, in conjunction with Gremial de Huleros (rubber growers' association), during which conformity checks were made on 14 south coast plantations (photo 2) and the technology was successfully transferred, with the delivery of a portable laboratory and training for technicians.

In French Guiana, an electrophoresis unit has been set up in the CIRAD laboratories in Kourou, for regular checks in the collection budwood gardens and to certify the conformity of the planting material distributed, by electrophoresis.

The technique is currently being transferred to the Michelin estates in Brazil.

The following two examples, obtained during assessment missions with the portable laboratory, are typical of the possible electrophoresis applications as regards clone conformity.

### Conformity check in a PB 235 budwood garden

Following an analysis in a PB 235 budwood garden, differences in the number and position of bands for the MDH (Malate Dehydrogenase) and AP (Acid Phosphatase) systems revealed that 2 out of the 20 individuals analyzed had a different zymogram, hence genotype, from the other individuals (Nos. 424 and 425, photo 3). These two individuals were not true-to-type. They did not belong to clone PB 235.

### Case of PR 261 in Africa

The example of clone PR 261 in an African country is also typical of how well the portable laboratory works.

Initially, enzymatic analysis of a PR 261 «source» budwood garden revealed that the clone multiplied under this name had a different genotype from the Asian PR 261. This African clone was therefore renamed AF 261. It could therefore be expected that all the PR 261 plantations in the country were in fact AF 261.

Moreover, field observations in the same country in a PR 261 monoclonal plot had revealed the existence of 2 phenotypes:

- an A type tree, which was in the majority, corresponding to high-yielding material,
- a B type tree, which was in the minority, with high susceptibility to wind damage, leading to yield losses after several years.

Isozyme analysis first performed on the trees in this plantation, revealed that:

- the two phenotypes, A and B, did indeed correspond to different genotypes. Type B could not be attributed to any known clone,
- type A itself was genetically heterogeneous and made up of two genotypes: the first, in the majority, effectively corresponded to AF 261, the second could not be attributed to any known clone.

Thus, this «PR 261» plot proved to be an AF 261 plot, «contaminated» by two unknown genotypes, and none of the three genotypes corresponded to the Asian PR 261.

The budwood garden corresponding to the plot previously studied was then analyzed using the portable laboratory. The isoenzymatic genotype, established for a sample of 81 rootstocks, showed that:

- the clonal conformity errors came from the budwood garden itself and not from budding

errors, with the three genotypes identified in the plantation occurring in equal proportions in the budwood gardens,

- these clonal impurities were not detectable with the naked eye at the juvenile stage, which demonstrated the merits of using isoenzymatic markers *in situ*.

### Conclusion

During these different operations, the portable electrophoresis laboratory proved its reliability for detecting *Hevea* clone conformity errors in the field.

However, this technique is limited by the number of individuals that can be analyzed each day (25 on average). Its most effective use is for budwood garden checks. In the event of detected heterogeneity, it can, through rational sampling, pinpoint with certainty those rootstocks that are true-to-type and which will be used to set up new, perfectly pure budwood gardens. In turn, these new budwood gardens should be checked regularly, at the time of periodic cutting back operations, which are potential sources of error.

Apart from specific cases, it cannot be used to solve identification problems after the event, if there are clone mixes in plantations. Neither is it a way of identifying clones of unknown origin «in the dark», but it can be used to check whether a clone corresponds to the name attributed to it, by comparison to a reference.

Use of the portable laboratory should be expanded, either through assessment missions or technology transfers. The latter option is currently being considered for forthcoming clonal conformity checks in Indonesia and Côte d'Ivoire.

Apart from its direct application in planting material production for plantations, the isozyme electrophoresis technique offers other possible applications, developed by the CIRAD laboratories in Montpellier, as back-up for *Hevea* genetic improvement programme: checking progeny legitimacy, studying open pollination, germplasm management.

Today, isozyme electrophoresis used for *Hevea* clone identification combines reliability, easy use and low cost. Whilst its ability to distinguish between genotypes is less than that of molecular biology methods that directly analyze DNA (RFLP), it remains competitive in that these latter methods are too cumbersome for application in the field and are reserved for highly specific use in the laboratory. Nevertheless, new molecular biology tools, such as PCR (Polymerase Chain Reaction) could open up new prospects in the field of clone identification, combining the power of DNA analysis with protocols as simple as for isozymes and automation possibilities.



### Résumé

Chez l'hévéa, la multiplication à grande échelle de matériel végétal non conforme peut gravement compromettre la rentabilité économique des plantations. Afin de réaliser, à un stade précoce de leur croissance, la caractérisation génotypique des clones, l'électrophorèse d'isoenzymes a été développée. Avec 98% de pouvoir de séparation pour les principaux clones cultivés, cette technique s'est révélée particulièrement performante. L'équipement nécessaire simple et le coût de fonctionnement relativement faible de cette technique permettent son application en routine à l'identification clonale de l'hévéa. Une unité mobile d'électrophorèse ou «laboratoire portable» a été créée en vue d'intervenir directement sur plantation pour effectuer des contrôles de conformité en jardins à bois de greffe. Elle a été utilisée avec succès en Côte d'Ivoire, en Indonésie, en Guyane et en Guadeloupe sur un grand nombre d'individus. Elle est proposée sous forme de missions d'expertise ou de transferts de technologie.

### Abstract

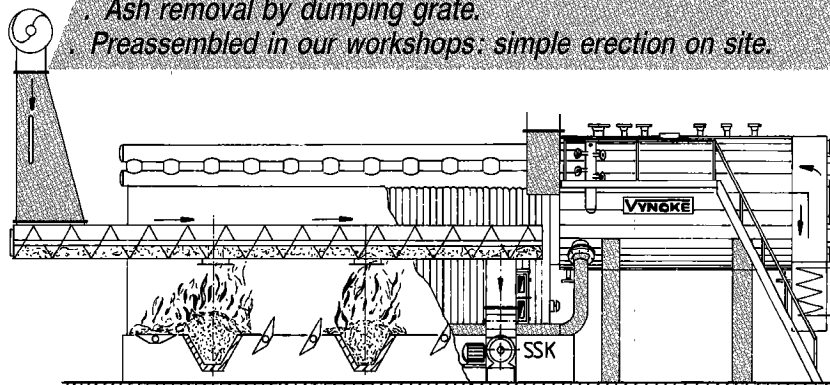
Large-scale multiplication of *Hevea* planting material that is not true-to-type can seriously jeopardize the economic profitability of plantations. Isoenzyme electrophoresis has been developed to characterize clone genotypes at an early stage in their growth. This technique has proved particularly effective, with 98% separation ability for the main clones cultivated. As the equipment required is simple and operating costs are relatively low, *Hevea* clone identification using this technique has become routine. A mobile electrophoresis unit or «portable laboratory» has been developed for direct conformity checks in budwood gardens on plantations. It has been successfully used in Côte d'Ivoire, Indonesia, French Guiana and Guadeloupe on many individuals. It is proposed through assessment missions or technology transfers.

### Resumen

Para el hevea, la multiplicación a gran escala de material vegetal que no es conforme puede comprometer gravemente la rentabilidad económica de las plantaciones. Con el fin de realizar, en una fase precoz de su crecimiento, la caracterización genotípica de los clones, se ha desarrollado la electroforesis de isoenzimas. Esta técnica se ha revelado particularmente eficiente con un 98% de poder de separación de los principales clones cultivados. Su aplicación a la identificación clonal del hevea pudo realizarse de una forma rutinaria, siendo sencillos los equipos necesarios, de un costo de funcionamiento relativamente bajo. Se ha creado una unidad móvil de electroforesis o «laboratorio portátil» con el fin de intervenir directamente en el campo para efectuar controles de conformidad en jardines clonales. Se aplicó, con éxito, la técnica en Côte d'Ivoire, en Indonesia, en Guyana y en Guadalupe en un gran número de individuos. Está propuesta en forma de misiones de peritaje o de transferencia de tecnología.

## VYNCKE BOILERS: SPECIALLY DESIGNED FOR PALM FRUIT WASTE

- Combined water tube-fire tube boiler: sturdy, reliable design offering easy access and maintenance.
- Underfeed stoker: stable and complete combustion.
- Ash removal by dumping grate.
- Preassembled in our workshops: simple erection on site.



capacities  
0.5 - 20 tons/h

# VYNCKE

vyncke nv  
b-8530 harelbeke - belgium  
tel 32-56/71 82 31  
fax 32-56/70 41 60

Over 1,000 references in solid fuel combustion.

artex